

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

10/520901

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 15 日 (15.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/005511 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, 7/01 //
A61K 48/00, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008573
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 7 日 (07.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-198941 2002 年 7 月 8 日 (08.07.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 関西ティール・エル・オー株式会社 (KANSAI TECHNOLOGY LICENSING ORGANIZATION CO., LTD.) [JP/JP]; 〒600-8815 京都府京都市下京区中堂寺栗田町9番地 Kyoto (JP).
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 藤原 俊義 (FUJIWARA, Toshiyoshi) [JP/JP]; 〒703-8281 岡山県岡山市東山3-5-30 Okayama (JP).
田中 紀章 (TANAKA, Noriaki) [JP/JP]; 〒719-0252 岡山県浅口郡鴨方町六条院中3235-1 Okayama (JP).
京 哲 (KYO, Satoru) [JP/JP]; 〒921-8117 石川県金沢市緑が丘19-20 Ishikawa (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 白木屋 佳子 (SHIRAKIYA, Yoshiko) [JP/JP]; 〒710-0803 岡山県倉敷市 中島 663-20 メルベユ 24 B-102 Okayama (JP). 川嶋 健 (KAWASHIMA, Takeshi) [JP/JP]; 〒700-0914 岡山県岡山市鹿田町1-48 倉番館 1402 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TUMOR-LYSING VIRUS GROWING SELECTIVELY IN TUMOR CELLS

(54) 発明の名称: 腫瘍細胞において選択的に増殖する腫瘍融解ウイルス

(57) Abstract: By using a telomerase promoter with a virus having a gene sequence containing an E1 gene (preferably E1A gene), an IRES sequence and a sequence containing E1B gene and an anticancer agent with the use of this virus, the virus grows in tumor cells and thus exhibits an efficient anticancer effect.

(57) 要約: テロメラーゼのプロモーターと、E1 遺伝子、好ましくは E1A 遺伝子、IRES 配列及び E1B 遺伝子を含む配列とを含む遺伝子配列を有するウイルス及び該ウイルスを用いた抗癌剤を用いることによって、前記ウイルスが腫瘍細胞において増殖することにより、効率の良い抗癌作用を示す。

WO 2004/005511 A1

明 細 書

腫瘍細胞において選択的に増殖する腫瘍融解ウイルス

5

技術分野

本発明は、腫瘍細胞において増殖することにより抗腫瘍作用を示すウイルス、該ウイルスに含まれるポリヌクレオチド、該ウイルスを含む抗癌剤及び該ウイルスを用いた癌の治療方法に関する。

10

背景技術

現在、癌の治療方法の 1 つとして、遺伝子治療が行われている。しかし、遺伝子治療では、非増殖性ウイルスベクターを用いて患部組織等に遺伝子が導入されるため、人体の安全を考慮して標的細胞の周囲にしか適用できない。また、現在の遺伝子治療では、遺伝子の導入効率が低いために満足のいく治療効果が得られない。

15

癌化した細胞又は不死化した細胞株では、テロメラーゼの活性が増大していることが多く、一方、生殖系の細胞、血球系細胞、上皮系幹細胞等以外の正常な体細胞では、テロメラーゼの活性はほとんど検出されないことが知られている。

20

そこで、本発明の主な目的は、腫瘍細胞において活性化しているテロメラーゼを利用することにより腫瘍細胞においてウイルスを増殖させ、腫瘍細胞を効率良く死滅させることである。

図面の簡単な説明

25

図 1 は、腫瘍細胞において選択的に増殖する腫瘍融解ウイルスの構造の模式図を示す。非増殖性ウイルスベクターでは欠失している E1 遺伝子領域に、hTERT プロモーター、E1A 遺伝子、IRES 配列及び E1B 遺伝子からなる増殖カセットが挿入されている。

図 2 は、ヒト癌細胞および正常細胞におけるテロメラーゼ活性の比較を示す。

図 3 は、ヒト癌細胞および正常細胞における TRAD 感染後の E1A 及び E1B の

mRNA 及びタンパク質の発現を示す。

図 4 は、ヒト癌細胞及び正常細胞における TRAD 感染後の細胞内における増殖を示す。

図 5 は、ヒト癌細胞及び正常細胞における TRAD による細胞障害活性を
5 Coomassie brilliant blue 染色によって示した写真である。

図 6 は、ヒト癌細胞及び正常細胞における TRAD による細胞障害活性を顕微鏡写真で示したものである。

図 7 は、ヒト癌細胞及び正常細胞における TRAD による細胞障害活性を XTT アッセイにより示したグラフである。

10 図 8 は、ヌードマウスとヒト肺癌細胞 H358 を用いた非増殖性 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクターの腫瘍内局所投与の抗腫瘍効果を示したグラフである。

図 9 は、ヌードマウス及びヒト大腸癌細胞 SW620 を用いた TRAD の腫瘍内局所投与の抗腫瘍効果を示したグラフである。

15 発明の開示

本発明者は、テロメラーゼのプロモーターと増殖能とを有するウイルスを癌細胞に感染させることにより、癌細胞でウイルスが増殖し、癌細胞を死滅させることができることを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の項 1~10 に関する。

- 20 1. ヒトテロメラーゼのプロモーター及び少なくとも 1 種の E1 遺伝子を含むポリヌクレオチド。
2. E1 遺伝子がアデノウイルス由来の E1 遺伝子である前記項 1 に記載のポリヌクレオチド。
3. ヒトテロメラーゼのプロモーターが hTERT である前記項 1 又は 2 に記載の
25 ポリヌクレオチド。
4. E1 遺伝子が、E1A 遺伝子、IRES 配列及び E1B 遺伝子をこの順に含む前記項 1~3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
5. 前記項 1~4 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むウイルス。
6. ウイルスがアデノウイルスである前記項 5 に記載のウイルス。

7. 前記項 5 又は 6 に記載のウイルスを有効成分として、薬学的に許容される担体、賦形剤又は希釈剤を含有する抗癌剤。

8. 前記項 5 又は 6 に記載のウイルス又は請求項 7 に記載の抗癌剤を用いた癌の治療方法。

5 9. 癌が、胃、大腸、肺、肝、前立腺、脾、食道、膀胱、胆嚢・胆管、乳房、子宮、甲状腺及び卵巣からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の癌である前記項 8 に記載の治療方法。

10. 癌が、骨肉腫及び脳腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である前記項 9 に記載の治療方法。

10

発明の詳細な記述

本発明は、多くの種類の癌細胞がテロメラーゼ活性を有するという知見に基いて、テロメラーゼのプロモーター及び増殖能を有するウイルスを癌細胞に感染させ、癌細胞において当該ウイルスを増殖させることにより、癌細胞を死滅させることを特徴とする。

15

本発明において用いられるウイルスは特に限定されないが、安全性等の点からアデノウイルスが好ましい。また、アデノウイルスの中でも、使用の簡便さ等の点からタイプ 5 のアデノウイルスが特に好ましい。

ウイルスのポリヌクレオチドに含まれる E1 遺伝子とは、ウイルスの有する DNA 複製に関する初期遺伝子 (early : E) と後期遺伝子 (late : L) のうちの初期遺伝子の一つをいい、E1 遺伝子はウイルス・ゲノムの転写の制御に係わるタンパク質をコードする。

20

本発明において用いる E1 遺伝子は、どのウイルス由来のものも使用できるが、アデノウイルス由来のものが好ましい。

25 また、E1 遺伝子は、E1A、E1B 等から構成されることが知られている。E1A 遺伝子によりコードされる E1A タンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群 (E1B、E2、E4 等) の転写を活性化する。

E1B 遺伝子によりコードされる E1B タンパク質は、後期遺伝子 (L 遺伝子) の mRNA が感染した宿主細胞の細胞質へ蓄積するのを助け、宿主細胞のタンパ

ク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。アデノウイルスの E1A 遺伝子及び E1B 遺伝子の配列は、それぞれ以下の配列 1 及び 2 に示す。

本発明において、E1 遺伝子は公知のものをそのまま用いることもできるが、E1A 遺伝子、IRES 配列及び E1B 遺伝子をこの順に有するもの、即ち、IRES 配
5 列を E1A 遺伝子と E1B 遺伝子との間に挿入したものを使用することが好ましい。ウイルスが宿主細胞に感染した際に、増殖能が高くなるからである。

本発明の効果を達成し得るのであれば、IRES 配列と E1A 遺伝子との間、IRES 配列と E1B 遺伝子との間、E1A 遺伝子の上流及び E1B 遺伝子の下流からなる群から選ばれる少なくとも 1 ヶ所に、少なくとも 1 個のヌクレオチドが挿入されて
10 いてもよい。また、本発明の効果を達成し得るのであれば、E1A 遺伝子、IRES 配列、E1B 遺伝子又は E1 遺伝子において、少なくとも 1 個、好ましくは複数個のヌクレオチドが置換、欠失、挿入又は付加されていてもよい。

IRES 配列とは、ピコルナウイルス科のウイルスに特異的なタンパク質合成開始シグナルであり、18S リボソーム RNA の 3'末端と相補的な配列があるためリ
15 ボソーム結合部位としての役割を果たすと考えられている。ピコルナウイルス科のウイルス由来の mRNA はこの配列を介して翻訳されることが知られている。

IRES 配列からの翻訳効率が高く、mRNA の途中からでもキャップ構造非依存的にタンパク質合成が行われる。従って、本ウイルスでは、ヒトテロメラーゼのプロモーターにより E1A 遺伝子と IRES 配列の下流にある E1B 遺伝子の両方が
20 独立に翻訳される。IRES 配列を以下の配列 3 に示す。

また、本発明において、E1 遺伝子は、その上流にヒトテロメラーゼのプロモーターを有することが好ましい。テロメラーゼ活性を有する癌細胞内で、本発明のウイルスの増殖を促進させることができるからである。ヒトテロメラーゼのプロモーターは、ヒト由来のプロモーターであれば種類などは限定されないが、そ
25 の中で hTERT が好ましい。

hTERT はヒトテロメラーゼ逆転写酵素をコードする遺伝子であり、その 5'末端の上流 1.4kbp の領域には多くの転写因子結合配列が確認されている。その領域が hTERT プロモーターであると考えられるが、中でも翻訳開始部位の上流 181 bp の配列が下流の遺伝子発現に重要なコア領域である。

本発明において、ヒトテロメラーゼのプロモーターとしては、このコア領域を含むものであれば限定されずに使用することができるが、このコア領域を完全に含む上流378 bp程度の配列をhTERTプロモーターとして使用するのが好ましい。この378 bp程度の配列は、その遺伝子発現効率が181 bpのコア領域単独の場合と同等であることが確認されている。hTERTの配列を以下の配列4示す。

本発明のテロメラーゼのプロモーター及びE1遺伝子（E1A遺伝子、IRES遺伝子及びE1B遺伝子を含む遺伝子）を有する遺伝子は、通常の遺伝子工学的手法により得ることができる。

E1遺伝子としては、それを有する公知のウイルスのものが使用できるが、好ましくはアデノウイルスのE1遺伝子が好ましい。

また、例えば、E1遺伝子を発現している細胞、好ましくはE1遺伝子を発現させた293細胞等からE1A-S、E1A-AS、E1B-S、E1B-AS等のプライマーを用いて、RT-PCR及び／又はDNA-PCRを行うことによりE1A遺伝子及びE1B遺伝子を増幅することができる。必要に応じてTAクローニングのような公知の方法を用いて配列を確認した後、EcoRIのような公知の制限酵素でE1A及びE1BのDNA断片を切り出すことができる。

pIRESのような公知のベクターに、通常の遺伝子工学的手法によりE1A及びE1Bを挿入し、該ベクター中にE1A-IRES-E1B配列を作成することができる。次いで、MluI、BglII等の制限酵素で切り出したhTERTプロモーター配列を、E1Aの上流にあるXhoI等の部位に挿入することができる。

必要に応じて、pShuttle等の公知のベクターに含まれるサイトメガロウイルス（CMV）プロモーターをMfeI、NheI等の制限酵素により取り除き、その部位にphtERT-E1A-IRES-E1Bより制限酵素NheIおよびNotIで切り出した配列を挿入することができる（得られたものを「pSh-hAIB」という。）。

pSh-hAIBからI-CeuI、PI-SceI等の制限酵素により必要な部分の（hTERTプロモーター、E1A遺伝子、IRES配列及びE1B遺伝子を含む）配列を切り出し、Adeno-X Expression System（CLONTECH）等の市販のキットを用いてAdeno-X Viral DNA等のウイルスのDNAに挿入することができる（得られたものを「AdenoX-hAIB」という。）。

上記の hTERT プロモーター、E1A 遺伝子、IRES 配列及び E1B 遺伝子を含む配列は、本発明の効果を達成し得るのであればウイルスの遺伝子のどの部分に挿入してもよいが、例えば、遺伝子治療用のアデノウイルスにおいては、E1 遺伝子を欠損させているので、その欠損させた部分に挿入するのが好ましい。

5 AdenoX-hAIB を PacI 等の公知の制限酵素により線状化した後、293 細胞等の培養細胞にトランスフェクションし、感染性のある組換えアデノウイルスを作製することができる（得られたウイルスを、「本発明のウイルス」又は「TRAD」ということがある。）。トランスフェクションする方法も限定されず、効率の点からリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション等を用いることが好ましい。

10 上記のようにして得られた本発明のウイルスは、通常ウイルスを増殖させる方法、例えば 293 細胞等の宿主細胞に感染させるなどして増殖させることができる。

本発明のウイルスは、抗癌剤として使用することができる。例えば、癌の治療だけでなく、手術後の再発予防、転移の防止及び／又は予防等にも使用できる。

15 本発明の抗癌剤を適用する癌の種類としては、限定されるものではなく、あらゆる種類の癌に用いることができる。例えば、胃、大腸、肺、肝、前立腺、膵、食道、膀胱、胆嚢・胆管、乳房、子宮、甲状腺、卵巣等における癌や、脳腫瘍、骨肉腫等に有効であり、その中でも固形癌により有効である。

20 本発明の抗癌剤は、そのまま患部に適用することもできるし、あらゆる公知の方法、例えば、静脈、筋肉、腹腔内又は皮下といった注射、鼻腔、口腔又は肺からの吸入、経口投与、坐剤、外用剤等によりヒト（対象となる細胞や臓器）に導入することもできる。

25 また、本発明のウイルスは、例えば凍結乾燥などの方法により扱いやすくした後、そのまま若しくは賦形剤、増量剤、結合剤、滑沢剤等公知の薬学的に許容される担体、公知の添加剤（緩衝剤、等張化剤、キレート剤、着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等が含まれる。）などと混合して医薬組成物として調製することができる。

本発明の抗癌剤は、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、丸剤、液剤、シロップ剤等の経口投与剤、注射剤、外用剤、坐剤、点眼剤等の非経口投与剤などの形態に応じて、経口投与又は非経口投与することができる。好ましくは、筋肉、腹腔

等への局部注射、静脈への注射等が例示される。

投与量は、有効成分の種類、投与経路、投与対象、患者の年齢、体重、性別、症状その他の条件により適宜選択されるが、一日投与量として、通常有効成分である本発明ウイルスの量を $10^6 \sim 10^{11}$ PFU 程度、好ましくは $10^9 \sim 10^{11}$ PFU 程度とするのがよく、1 日 1 回投与することもでき、数回に分けて投与することもできる。

また、本発明のウイルスを使用する際には、公知の免疫抑制剤等を用いることにより、生体の免疫を抑制し、該ウイルスが感染し易くすることもできる。

更に、本発明のウイルスは、従来の遺伝子治療で用いられている例えば p53 遺伝子を含むような非増殖性ウイルス、公知の抗癌剤及び放射線からなる群から選ばれた少なくとも 1 種の抗癌剤を併用することもできる。

生体（癌細胞や癌組織）に感染した本発明のウイルスは、該細胞内で増殖し、該細胞を死滅させることができる。このように癌細胞を死滅させることにより、癌を治療したり、癌細胞の増殖を抑制したり、転移を防いだりすることができる。

本発明の抗癌剤は、以下の理由で副作用が生じる可能性は極めて低いと考えられ、非常に安全な製剤であるということが出来る。

(1) 正常の体細胞ではテロメラーゼ活性がほとんどなく、また、アデノウイルス自体が造血細胞等の浮遊細胞には感染しにくいいため、本発明でいおいてアデノウイルスを使用した場合には、腫瘍の種類に対してより選択性が高くなる。

(2) 本発明のウイルスは増殖能を有するので、通常の遺伝子治療で用いられている非増殖性ウイルスよりも低い濃度で使用する事ができる。

(3) 本発明のウイルスが過剰に投与された場合であっても、生体内の通常の免疫作用によって抗ウイルス作用が働く。

25

実施例

以下、本発明を更に詳しく説明するために実施例を挙げるが、いうまでもなく本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1

<TRAD の作製>

293 細胞から抽出した RNA から特異的プライマー (E1A-S: 配列 5、E1A-AS: 配列 6) を用いて RT-PCR を行い、899 bp の E1A 遺伝子を増幅した。293 細胞から抽出した DNA よりプライマー (E1B-S: 配列 7、E1B-AS: 配列 8) を用いて DNA-PCR を行い、1823 bp の E1B 遺伝子を増幅した。

- 5 それぞれの PCR 産物の TA Cloning (TA Cloning Kit Dual Promoter; Invitrogen) を行い、シークエンスを確認した後、制限酵素 EcoRI により、各々 899 bp (E1A)、1823 bp (E1B) の DNA 断片を切り出した。

pIRES ベクター (CLONTECH) の MluI 切断部位に E1A を、SalI 部位に E1B をそれぞれ順方向に挿入した (E1A-IRES-E1B)。

- 10 制限酵素 MluI および BglII で切り出した 455 bp の hTERT プロモーター配列を、E1A-IRES-E1B の E1A 上流にある XhoI 部位に順方向に挿入した (phTERT-E1A-IRES-E1B)。

- pShuttle ベクターに含まれるサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを制限酵素 MfeI および NheI 処理により取り除き、その部位に
15 phTERT-E1A-IRES-E1B より制限酵素 NheI および NotI で切り出した 3828 bp の配列を挿入した (pSh-hAIB)。

- pSh-hAIB より制限酵素 I-CeuI および P1-SceI により 4381 bp の配列を切り出し、Adeno-X Expression System (CLONTECH) の Adeno-X Viral DNA に挿入した (AdenoX-hAIB)。AdenoX-hAIB を制限酵素 PacI 処理で線状化した後、
20 細胞にリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションし、感染性のある組換えアデノウイルスを作製した (TRAD)。TRAD の模式図を図 1 に示す。

実施例 2

<ヒト癌細胞及び正常細胞におけるテロメラーゼ活性の比較>

- ヒト肺癌細胞 (A549、H226Br、H1299)、ヒト大腸癌細胞 (SW620、DLD-1、
25 LoVo)、ヒト胎児腎臓細胞 293、SV40 遺伝子導入で不死化したヒト血管内皮細胞 HUVEC、ヒト正常線維芽細胞 (WI38、NHLF) の 10 種類の細胞から RNAzol (Cinna/Biotecx) を用いて RNA を抽出し、LightCycler および LightCycler DNA TeloTAGGG Kit (Roche Molecular Biochemicals) を用いてリアルタイム定量的 reverse transcription (RT) -PCR を行い、それぞれの細胞における

hTERT 遺伝子発現レベルを比較した。結果を図 2 に示す。

最も発現レベルの高かった A549 細胞を 1.0 として比較すると、A549、H226Br、H1299、SW620、DLD-1、LoVo などの癌細胞及び 293 細胞では 0.18~1.00 の hTERT 遺伝子発現が確認されたが、不死化した HuVEC 細胞や WI38、NHLF などの正常細胞ではその発現は検出されなかった。

実施例 3

＜ヒト癌細胞及び正常細胞における、TRAD 感染後の E1A 及び E1B の mRNA 及びタンパク質の発現＞

ヒト大腸癌細胞 SW620 及びヒト正常線維芽細胞 WI38 を in vitro で培養し、0.1 及び 1 MOI (multiplicity of infection) の濃度で TRAD を感染させ、36 時間後に RNA を回収した。陽性コントロールとして 293 細胞を用いた。

GeneAmp RNA PCR Core Kit を用いて RT を行い、E1A 及び E1B 遺伝子に対するプライマーを用いて GeneAmp PCR system 9700 thermal cycler (PE Applied Biosystems) により 30 サイクルの増幅を行った。PCR 産物を 1.2%アガロースゲル上で泳動し、エチジウムブロマイドで染色して可視化した (図 3A に上 2 つ)。バンドの強度をイメージアナライザーにて測定し、GAPDH を内部コントロールとして定量化してグラフ化した (図 3A の下)。

ヒト大腸癌細胞 SW620 及びヒト正常線維芽細胞 WI38 を in vitro で培養し、0.1 及び 1 MOI の濃度で TRAD を感染させ 48 時間後に付着細胞を回収、溶解液中で 30 分反応させた後に遠沈し、上清のタンパク質濃度を測定した。12%ポリアクリルアミドゲル上で泳動し、膜にトランスファーした後、抗アデノウイルス 5 型 E1A 抗体 (PharMingen International) を用いてウエスタンブロット解析を行った。結果を図 3B に示す。

癌細胞である SW620 においては、TRAD の感染により明らかに強い E1A 遺伝子 (502 bp)、E1B 遺伝子 (543 bp) の発現がみられたが、正常細胞である WI38 では、それらは弱い発現がみられたのみであった (図 3A)。陽性コントロールの 293 細胞では、それらは中等度の発現が認められた。

ウエスタンブロット解析では、SW620 において 0.1 MOI、1 MOI と TRAD の濃度に従って E1A タンパク質の発現が増強した (図 3B)。一方、WI38 では 1 MOI

の TRAD を使用しても、E1A タンパク質の発現はとんど検出さなかった。

実施例 4

<ヒト癌細胞及び正常細胞における TRAD 感染後の細胞内増殖の検討>

ヒト癌細胞 (SW620 及び H1299) 及びヒト正常細胞 (WI38 及び NHLF) に
5 TRAD を 1 MOI で 2 時間 37℃ で感染させ、TRAD を含む培養液を捨て、新しい
培養液で 1 回洗浄、さらに新しい培養液を加えた。その直後に Day 0 としてスク
レーパーで細胞を回収、凍結融解を繰り返した後に 1 ml の培養液に浮遊させた。
更に、同様の方法で Day 1、2、3、5、7 にウイルスを回収し、力価測定を行った。
結果を図 4 に示す。

- 10 正常細胞である WI38 や NHLF では、 10^2 PFU の TRAD が 3 日目には 10^5 PFU
程度と 100～1000 倍の増殖がみられたが、癌細胞である SW620 や H1299 では
 $10^7 \sim 10^8$ PFU と $10^5 \sim 10^6$ 倍の増殖が認められ、癌細胞特異的なウイルス増殖が
確認された。

実施例 5

- 15 <ヒト癌細胞および正常細胞における TRAD の細胞障害活性>

24 ウェルプレートに、5 種類のヒト癌細胞 (SW620、H1299、A549、DLD-1、
H226Br) を $6 \sim 8 \times 10^4$ 個/ウェル、及び 2 種類のヒト正常細胞 (WI38、NHLF)
を $2 \sim 4 \times 10^4$ 個/ウェルでそれぞれ蒔き、24 時間後に TRAD を 0.01、0.1、1、2、
5 MOI で感染させた。感染から 96 時間後に、顕微鏡下に SW620、DLD-1、NHLF
20 細胞の形態学的変化を観察した。更に、すべての細胞において、培養液を捨て、
生細胞を Coomassie brilliant blue で染色し、スキャナーにてマクロ画像を取り
込んだ。

- 96 ウェルプレートに SW620、H1299 を 10^4 個/ウェル、NHLF を 5×10^3 個
/ウェルで蒔き、TRAD を 0 (非感染細胞)、0.01、0.1、1 MOI で感染させ、XTT
25 アッセイにて Day 1、2、3、5、7 に生細胞数を計測した。4 ウェルずつで測定し、
非感染細胞を 1.0 として平均値 \pm SD にてグラフ化した。それぞれの結果を図 5、
6 及び 7 に示す。

SW620、H1299、A549、DLD-1、H226Br などの癌細胞では、TRAD の濃度
依存性に細胞数が減り、青く染まる領域が減少しているのがわかる。一方、WI38、

NHLFなどの正常細胞では、青く染色される生細胞数の顕著な減少は認められなかった。(図5)。

顕微鏡所見では、SW620、DLD-1 細胞はプレートの底面から剥がれて円形化し、細胞密度も減少していたが、NHLF ではほとんど形態学的変化はみられず、細胞数の減少も認められなかった (図6)。

SW620 および H1299 では、1 MOI の TRAD の感染により 3 日目までのほぼ 100% の細胞死が観察され、0.1 MOI でも 80% 以上の細胞数減少が認められた。これに対し、NHLF では 3 日目でもほとんど細胞数の減少はみられず、7 日目には 1 MOI の TRAD で 60% 程度の細胞数の低下が観察されたが、0.01 MOI では全くウイルスの影響はなかった (図7)。

実施例 6

<動物モデルを用いた TRAD の抗腫瘍活性の検討>

5-6 週齢ヌードマウスの背部皮下にヒト肺癌細胞 H358 を 5×10^6 個移植し、直径が約 5-6 mm となった時点で、p53 遺伝子を発現する非増殖性アデノウイルスベクター (Ad-p53) を 1×10^8 PFU、 3×10^8 PFU、 1×10^9 PFU を連日 2 日間腫瘍内局所注入した。その後、直交する腫瘍径を定期的に測定し、推定腫瘍重量を (長径) \times (短径)²/2 で算出した。コントロールとして挿入遺伝子をもたない非増殖性アデノウイルスベクター dl312 を用いた。

5-6 週齢ヌードマウスの背部皮下にヒト大腸癌細胞 SW620 を 5×10^6 個移植し、直径が約 5-6 mm となった時点で、 2×10^7 PFU の dl312 及び 4×10^3 PFU の TRAD を連日 3 日間腫瘍内局所注入した。同様に腫瘍径を測定し、推定腫瘍重量を算出した。結果を図 8 及び 9 に示す。(図中、Mock とはコントロールを示し、PBS (リン酸緩衝液) を投与した。)

3×10^8 PFU、 1×10^9 PFU の Ad-p53 投与により H358 腫瘍の増殖は有意に ($p < 0.05$) 抑制された。しかし、 1×10^8 PFU の Ad-p53 投与では有意な増殖抑制は認められなかった (図8)。また、コントロールの dl312 の投与では腫瘍増殖は全く影響されなかった。

抗腫瘍効果がみられた Ad-p53 よりも極めて低濃度である 4×10^3 PFU の TRAD の腫瘍内投与により、有意差をもって ($p < 0.05$) SW620 腫瘍の増殖が抑

制された。コントロールの dl312 の投与では腫瘍増殖は全く影響されなかった。

以上より、本発明のウイルスは効率良く癌細胞において増殖し、癌細胞を死滅
させることがわかる。また、本発明のウイルスは増殖能を有しているので、低濃
5 度でも大きな抗癌作用を発揮し、投与するウイルスを低濃度にするにより副
作用を抑制することもできる。

請求の範囲

1. ヒトテロメラーゼのプロモーター及び少なくとも 1 種の E1 遺伝子を含むポリヌクレオチド。
2. E1 遺伝子がアデノウイルス由来の E1 遺伝子である請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。
5
3. ヒトテロメラーゼのプロモーターが hTERT である請求項 1 又は 2 に記載のポリヌクレオチド。
4. E1 遺伝子が、E1A 遺伝子、IRES 配列及び E1B 遺伝子をこの順に含む請求項 1~3 のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
- 10 5. 請求項 1~4 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含むウイルス。
6. ウイルスがアデノウイルスである請求項 5 に記載のウイルス。
7. 請求項 5 又は 6 に記載のウイルスを有効成分として、薬学的に許容される担体、賦形剤又は希釈剤を含有する抗癌剤。
8. 請求項 5 又は 6 に記載のウイルス又は請求項 7 に記載の抗癌剤を用いた癌の
15 治療方法。
9. 癌が、胃、大腸、肺、肝、前立腺、脾、食道、膀胱、胆嚢・胆管、乳房、子宮、甲状腺及び卵巣からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の癌である請求項 8 に記載の治療方法。
10. 癌が、骨肉腫及び脳腫瘍からなる群から選ばれる少なくとも 1 種である
20 請求項 9 に記載の治療方法。

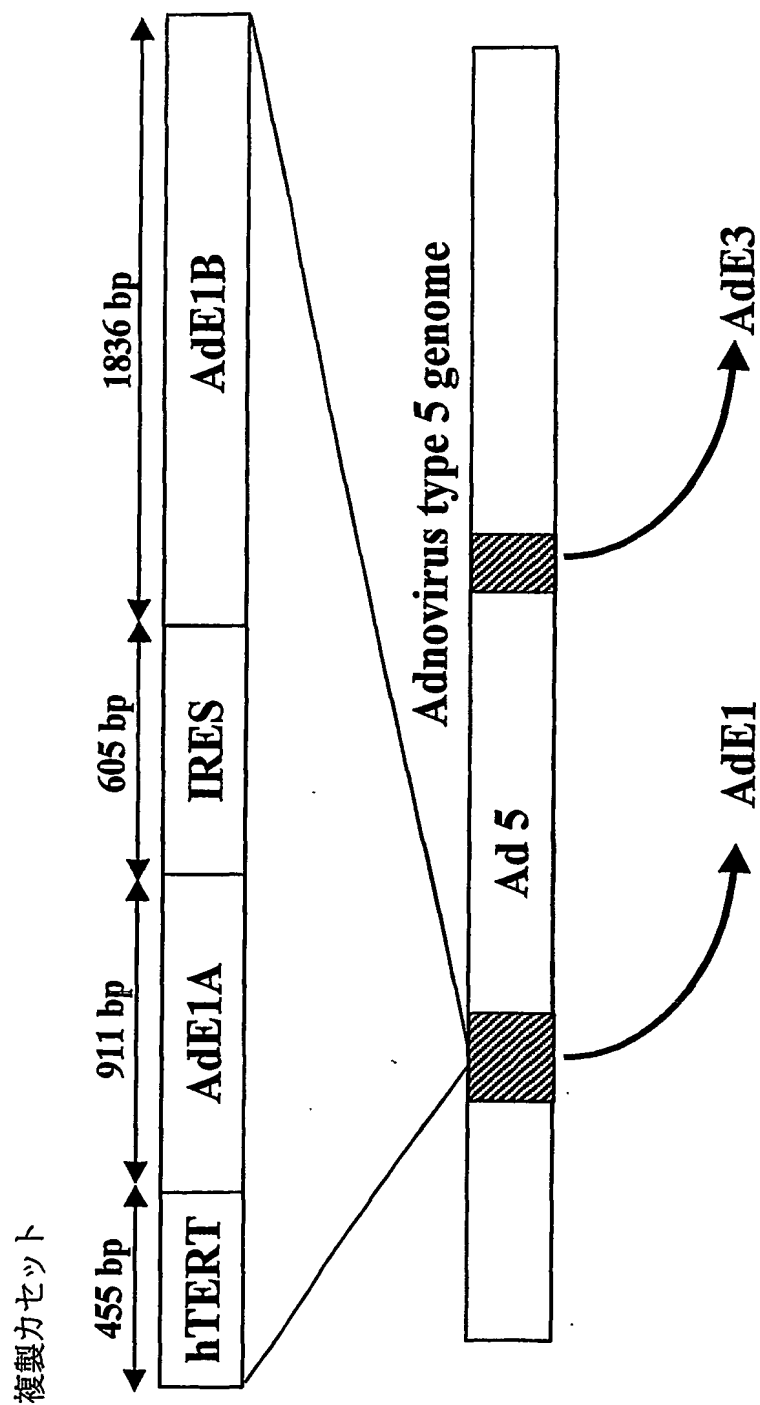


図 1

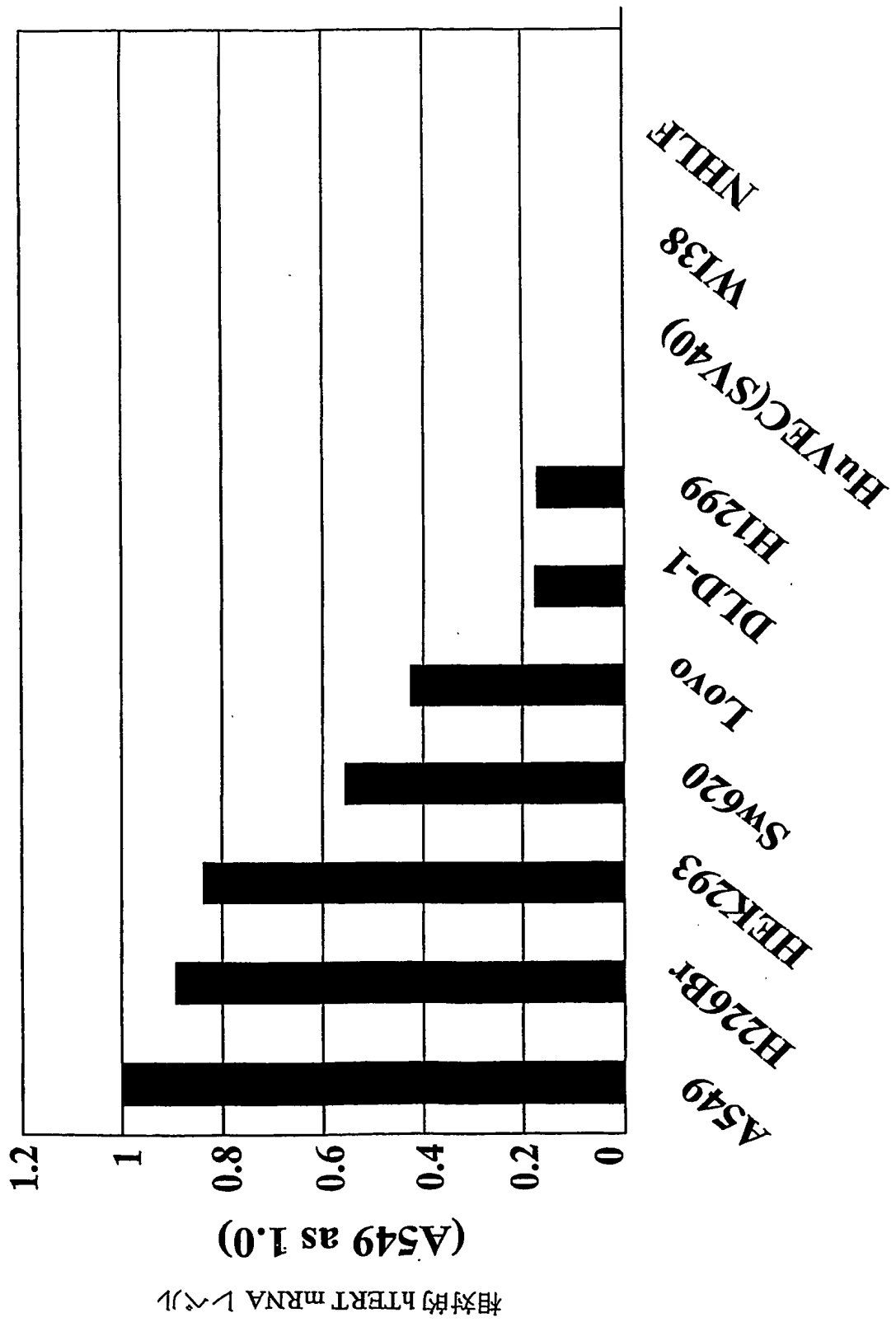
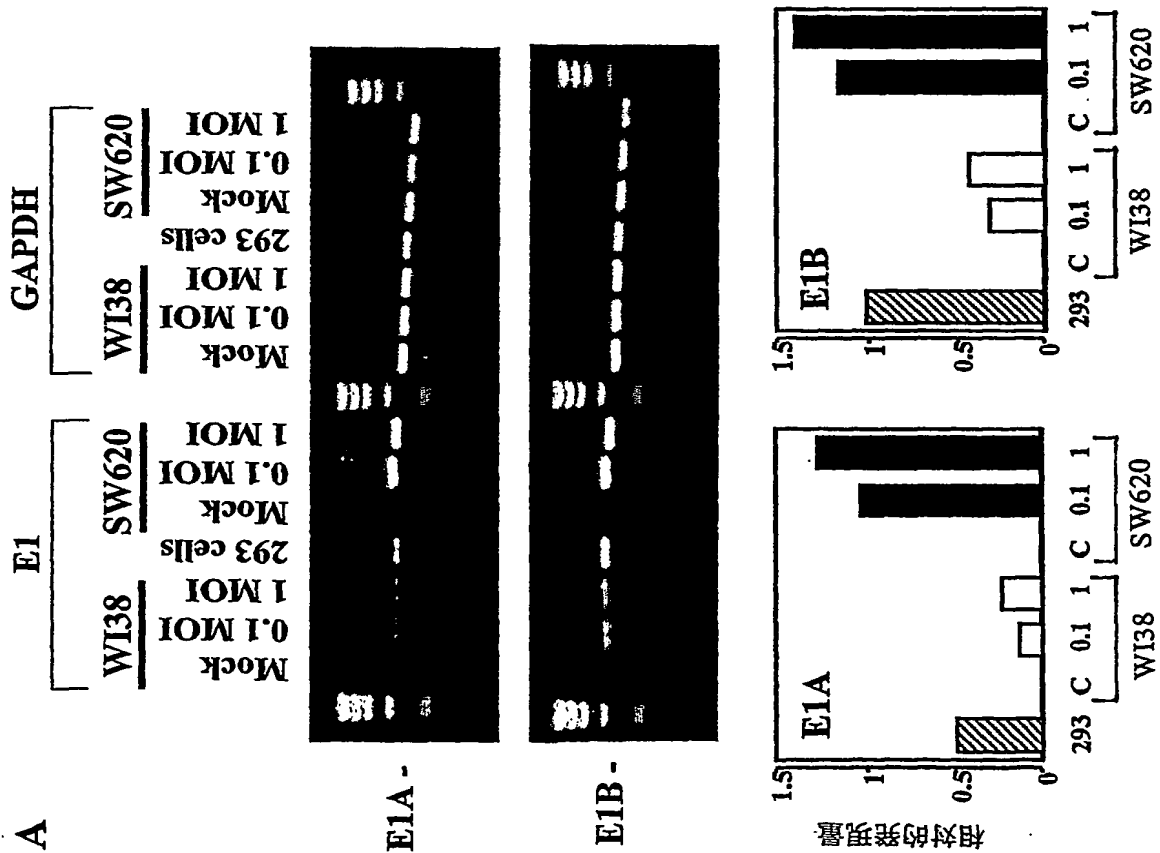


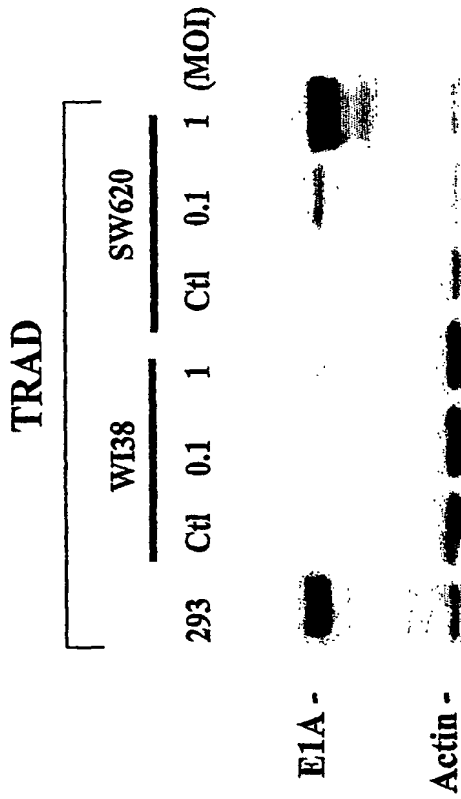
図2

図 3

A



B



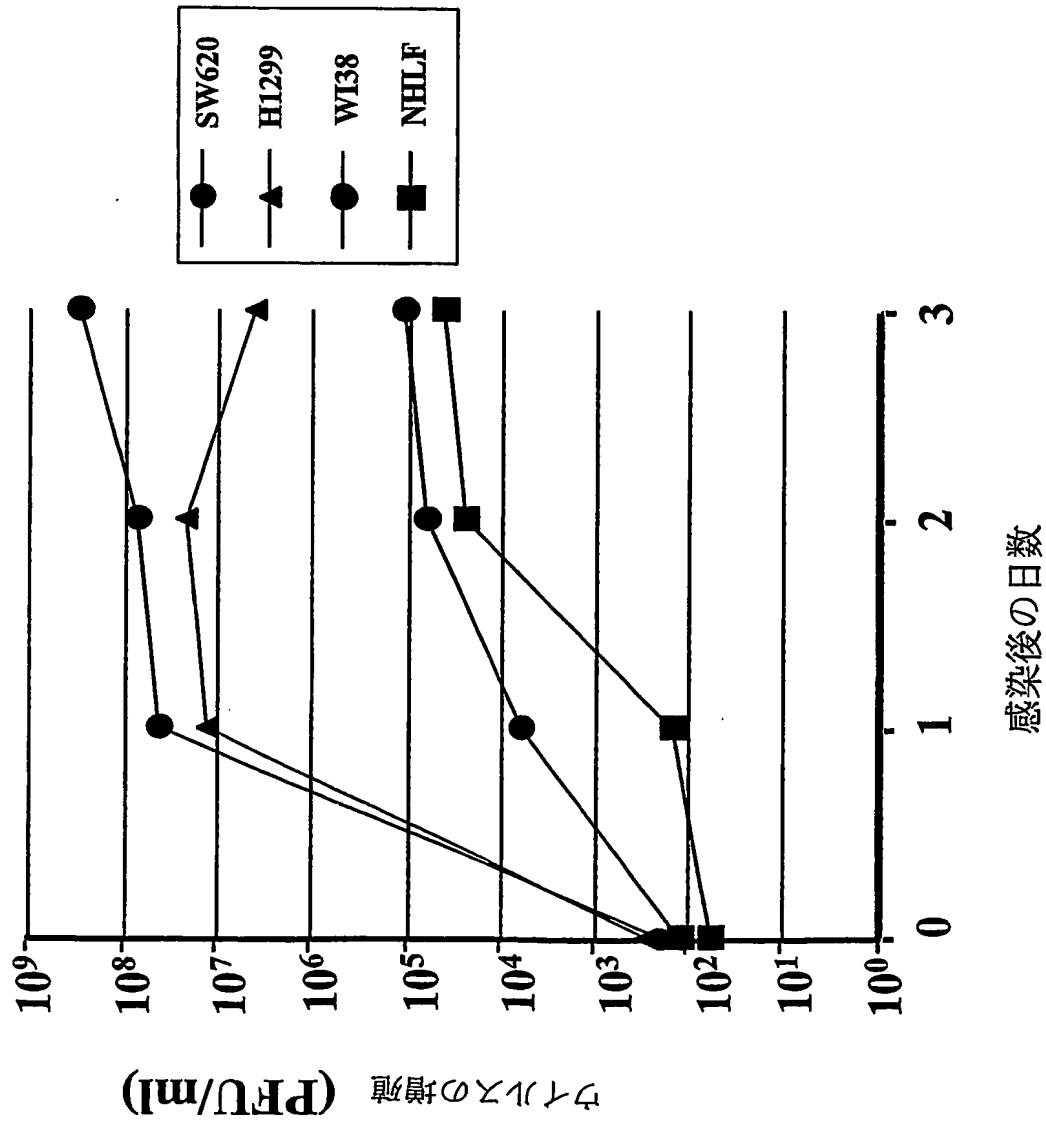
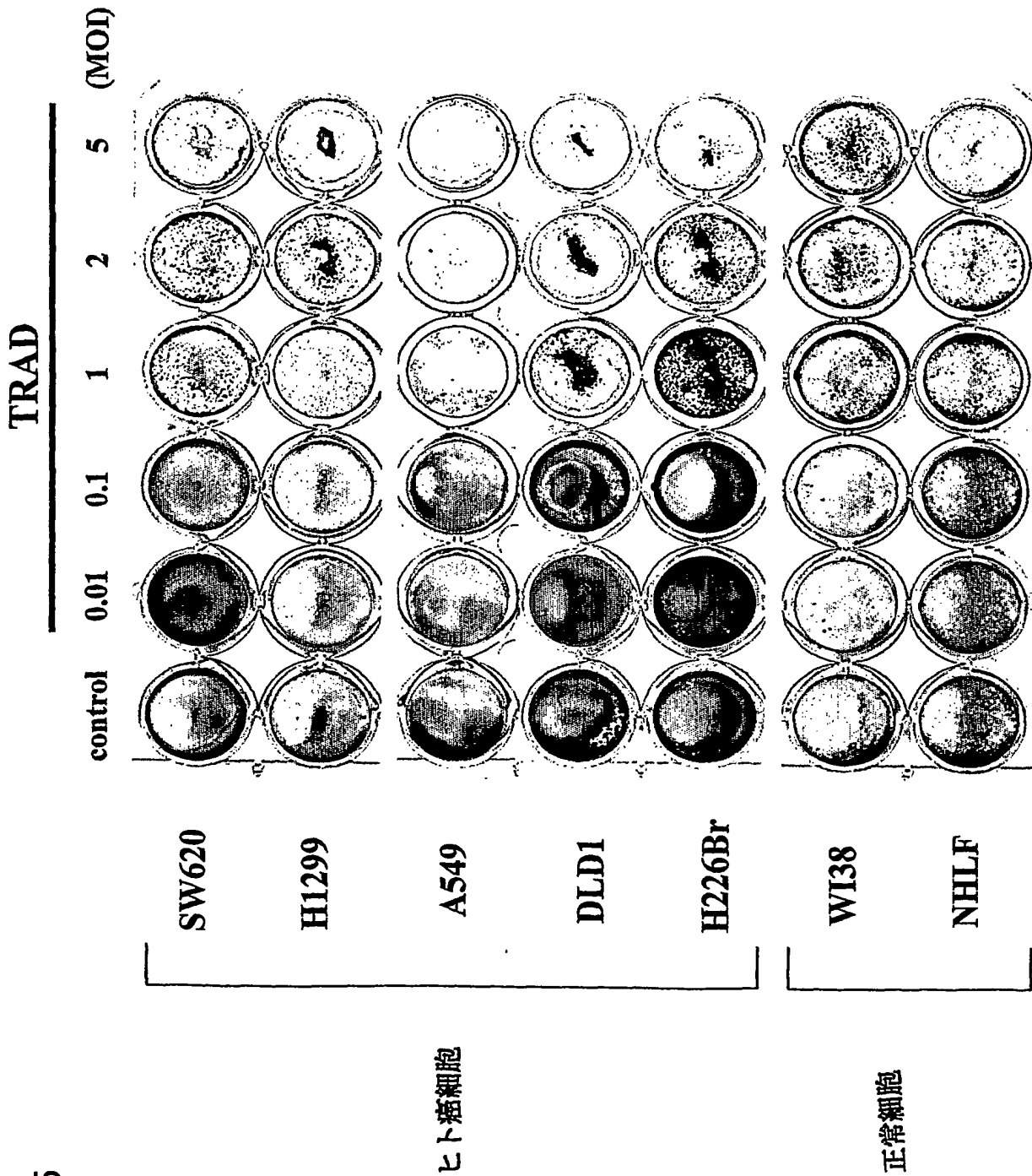


図4

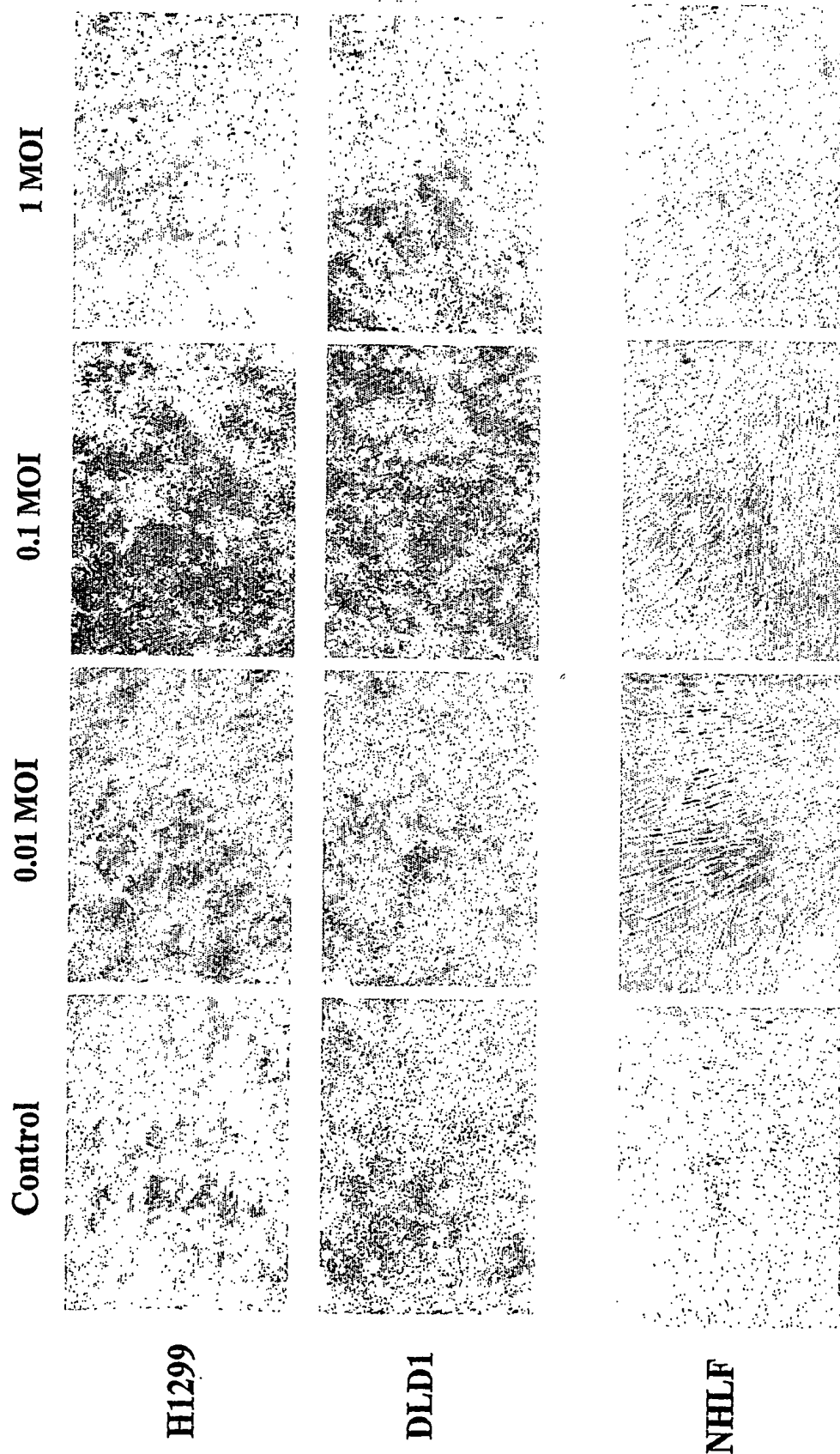


BEST AVAILABLE COPY

差替え用紙 (規則26)

6/9

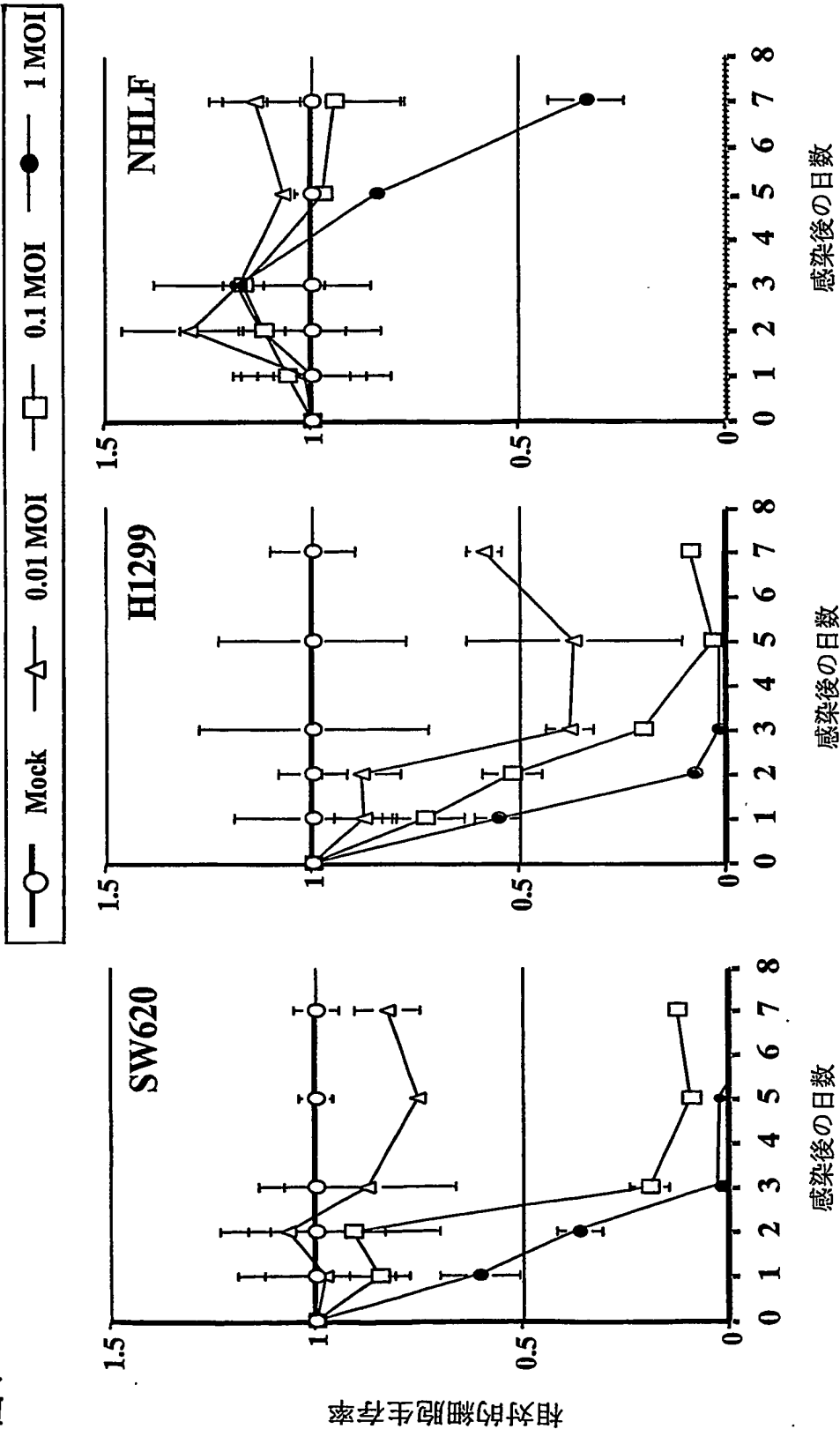
図 6

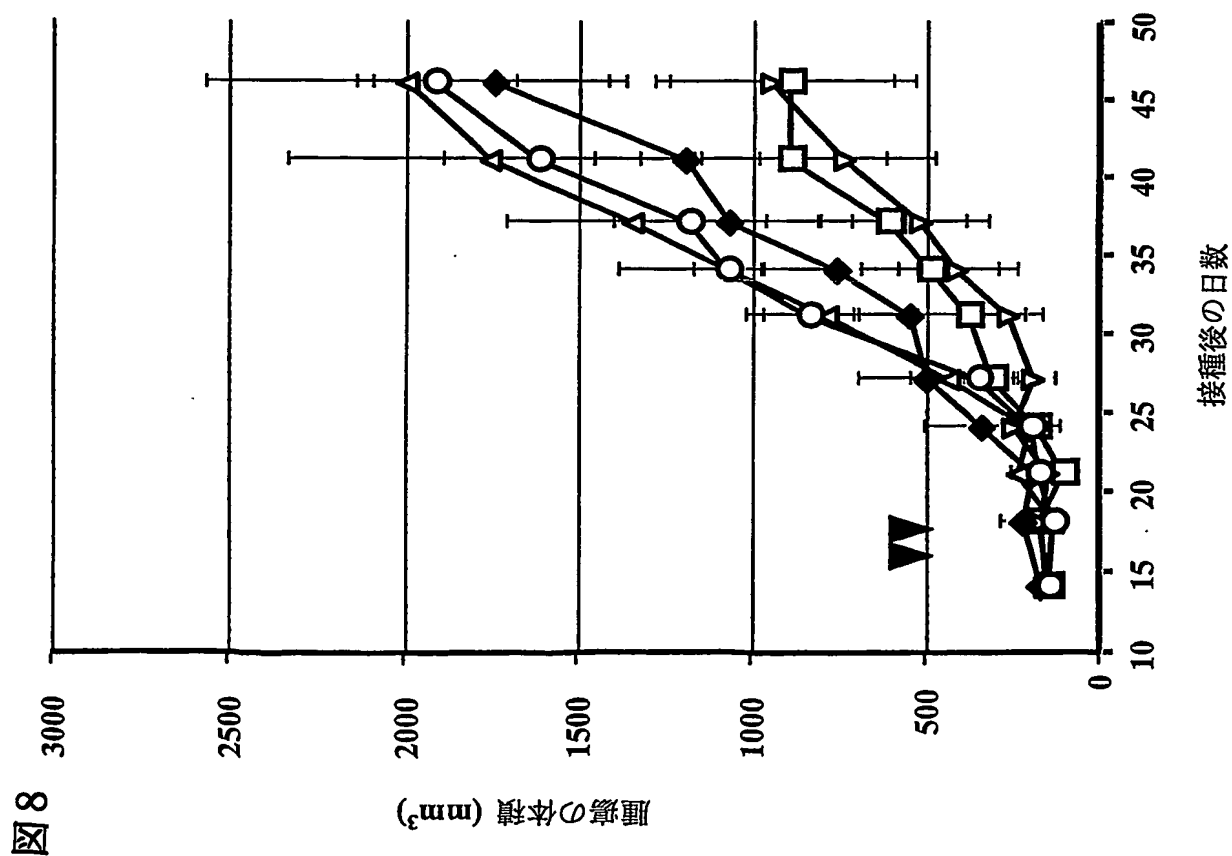


BEST AVAILABLE COPY

差替え用紙 (規則26)

図7





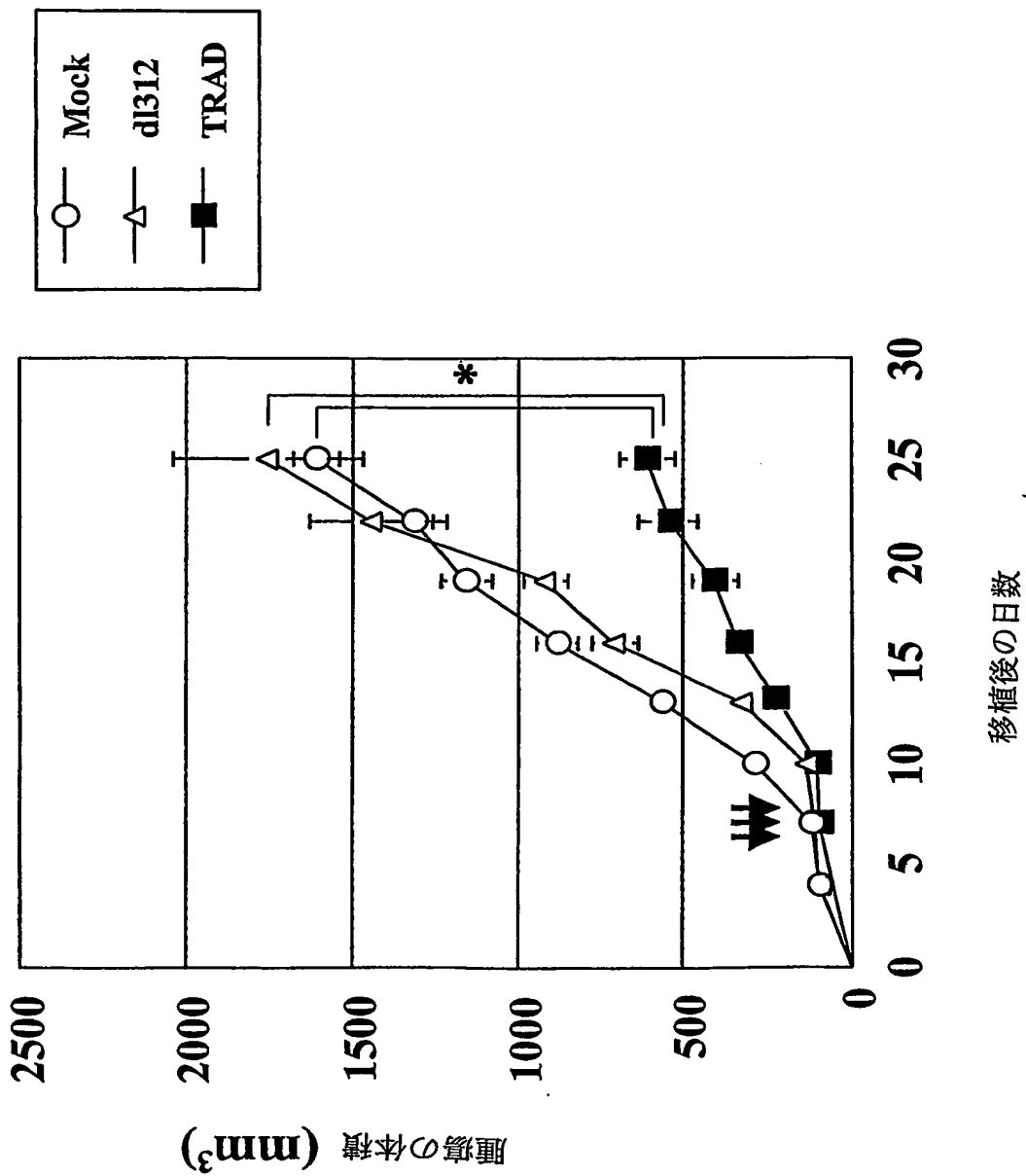


図 9

1/5
SEQUENCE LISTING

<110> KANSAI Technology Licensing Organization, Toshiyoshi FUJIWARA, Noriaki TANAKA,
Satoru KYO

<120> Oncolysis with Tumor-specific Replication-competent Virus

<130> P03-75

<150> JP2002-198941

<151> 2002-07-08

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 899

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 1

acaccgggac tgaaaatgag acatattatc tgccacggag gtgtatttac cgaagaaatg	60
gccgccagtc ttttggacca gctgatcgaa gaggtactgg ctgataatct tccacctcct	120
agccattttg aaccacctac ccttcacgaa ctgtatgatt tagacgtgac ggcccccgaa	180
gatcccaacg aggaggcggg ttcgcagatt tttcccgact ctgtaaigtg ggcgggtgcag	240
gaagggtattg acttactcac ttttccgccg gcgcccgggt ctccggagcc gcctcaccit	300
tcccggcagc ccgagcagcc ggagcagaga gccttgggtc cggtttctat gccaaacctt	360
gtaccggagg tgatcgatct tacctgccac gaggttggct ttcacccag tgacgacgag	420
gatgaagagg gtgaggagtt tgtgttagat tatgtggagc accccgggca cggttgcagg	480
tcctgtcatt atcaccggag gaatacgggg gaccagata ttaigtgttc gctttgctat	540
atgaggacct gtggcatgtt tgtctacagt cctgtgtctg aacctgagcc tgagcccag	600
ccagaaccgg agcctgcaag acctaccgc cgtcctaaaa tggcgctgc tatcctgaga	660
cgcccgacat cacctgtgtc tagagaaatgc aatagtagta cggatagctg tgactccggt	720

2/5

ccttctaaca caccicctga gataacccg gtggccccg tggccccat taaaccagtt	780
gccgtgagag ttggggggcg tggccaggct gtggaatgia tggaggactt gcttaacgag	840
cctgggcaac ctttggactt gagctgtaaa gccccaggc cataagggtg aaacctgtg	899

<210> 2

<211> 1823

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 2

ctgacctcat ggaggcttgg gagigitttg aagatttttc tgcgtgcgt aacttgctgg	60
aacagagctc taacagtacc tcttggtttt ggaggtttct ggggggtca tcccaggcaa	120
agttagictg cagaattaag gaggattaca agtgggaatt tgaagagctt ttgaaatcct	180
gtggtagcti gtttgattct ttgaatctgg gtcaccaggc gcttttccaa gagaaggta	240
tcaagacttt ggatttttcc acaccggggc gcgctgcggc tgcgttgct tttttgagtt	300
ttataaagga taaatggagc gaagaaaccc atctgagcgg ggggtacctg ctggattttc	360
tggccaigca tctgtggaga gcggttgta gacacaagaa tgcctgcta cgtttgtctt	420
ccgtccgcc ggcgataata ccgacggagg agcagcagca gcagcaggag gaagccaggc	480
ggcggcggca ggagcagagc ccatggaacc cgagagccgg cctggaccct cgggaatgaa	540
tgttgtacag gtggctgaac tctatccaga actgagacgc attttgaca ttacagagga	600
tgggcagggg cttaaagggg taaagaggga gcggggggct tgtgaggcta cagaggaggc	660
taggaatcta gcttttagct taatgaccag acaccgtctt gactgtatta cttttcaaca	720
gatcaaggat aattgcgcta atgagctga tctgctggcg cagaagtatt ccatagagca	780
gctgaccact tactggctgc agccagggga tgattttgag gaggctatta gggtatatgc	840
aaagggtggc cttaggccag attgcaagta caagatcagc aaactgttaa atatcaggaa	900
ttgttgctac atttctggga acggggccga ggtggagata galacggagg atagggtggc	960
ctttagatgt agcatgataa atatgtggcc gggggtgctt ggcatggacg ggggtggtat	1020
tatgaatgia aggtttactg gcccgaattt tagcggctac gttttcctgg ccaataccaa	1080

ccttatcccta cacggtgtaa gcttclatgg gtttaacaat accigigtgg aagcctggac 1140
 cgaigtaagg gticggggct gtgccittia ctgctgctgg aagggggigg igtgtcgccc 1200
 caaaagcagg gcttcaatta agaaalgctt ctttgaaagg tglacctigg gtatcctgtc 1260
 tgagggtaac tccagggtgc gccacaatgt ggcciccgac tlggttgct tcatgctagt 1320
 gaaaagcgtg gctgtgatta agcataacat ggtatgtggc aactgcgagg acagggcctc 1380
 tcagatgctg acctgctcgg acggcaactg tcacctgctg aagaccattc acgtagccag 1440
 ccactctcgc aaggcctggc cagtgtttga gcataacata ctgaccgct gticcttgca 1500
 tttgggtaac aggagggggg ttttctacc ttaccaatgc aatttgagtc acactaagat 1560
 attgcttgag cccgagagca tgtccaaggt gaacctgaac ggggtgtttg acatgaccat 1620
 gaagatctgg aagggtciga ggtacgatga gaccgcacc aggtgcagac cctgcgagtg 1680
 tggcggtaaa catattagga accagcctgt gatgciggtat gtgaccgagg agctgaggcc 1740
 cgaicacttg gtgctggcct gcacccgcgc tgagtttggc tctagcgatg aagatacaga 1800
 ttgaggtact gaaatgtgtg ggc 1823

<210> 3

<211> 605

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 3

tgcattctagg ggggccaatt cggccctct cctcccccc ccctaactg tactggccga 60
 agccgctigg aataaggccg gtgtgcgttt gtctataatg gatittccac catattgccg 120
 tcttttggca atgtgagggc ccggaacct ggccctgict tcttgacgag cattcctagg 180
 ggcttttccc ctctcgccaa aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa ggaagcagtt 240
 cccttggaag ctcttgaag acaaacacg tctgtagcga cctttgcag gcagcggaac 300
 cccccaccig gcgacaggtg cctctgcggc caaaagccac gigtataaga tacacctgca 360
 aaggcggcac aacccagtg ccacgttgtg agttggatag ttgtggaaag agtcaaatgg 420
 ctctcctcaa gcgtattcaa caaggggctg aaggatgccc agaaggtacc ccattglatg 480

4/5

ggatctgatac tggggcctcg gtgcacatgc ttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaaa 540
cgtctaggcc ccccgaaacca cggggacgtg gtttccctt gaaaaacacg atgataagct 600
tgcca 605

<210> 4

<211> 455

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 4

tggccctcc ctcgggttac cccacagcct aggcgattc gacctcttc cgtggggcc 60
ctcgtggcg tccctgcacc ctgggagcgc gagcggcgcg cgggcgggga agcgcggccc 120
agacccccgg gtccgcccgg agcagctgcg ctgctggggc caggccgggc tcccagtga 180
ttcgcgggca cagacgcca ggaccgcgt cccacgtgg cggagggact ggggacccgg 240
gcaccgltc tgccttca ccttccagct ccgctcttc cgcgcggacc ccgcccgtc 300
ccgacccctc ccgggtccc ggcccagccc cctcggggc ctcccagccc ctcccttcc 360
tttccgggc cccgcccct cctcgggcg cgagtctcag gcagcgtgc gtctgctgc 420
gcacgtggga agccctggcc ccggccacc ccgcg 455

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 5

acaccgggac tgaatatgag

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 6

cacaggttta caccttatgg c

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 7

ctgacctcat ggaggcttgg

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 293 cell

<400> 8

gcccacacat ttcagtacct c

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
P JP03/08573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N7/01//A61K48/00, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N7/01, A61K48/00, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Zhang J. et al., Identification of Human Uroplakin II Promoter and Its Use in the Construction of CG8840, a Urothelium-specific Adenovirus Variant That Eliminates Established Bladder Tumors in Combination with Docetaxel., Cancer Res., 01 July, 2002 (01.07.02), Vol.62, No.13, pages 3743 to 3750	1-7
Y	Kim J. et al., Antitumoral effects of recombinant adenovirus 'YKL-1001, conditionally replicating in small α -fetoprotein-producing human liver cancer cells., Cancer Letters, 06 June, 2002 (06.06.02), Vol.180, No.1, pages 23 to 32	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
07 October, 2003 (07.10.03)

Date of mailing of the international search report
21 October, 2003 (21.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

JP03/08573

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOMATA, T. et al., Caspase-8 gene therapy using the human telomerase reverse transcriptase promoter for malignant glioma cells., Hum.Gene Ther., 10 June, 2002 (10.06.02), Vol.13, No.9, pages 1015 to 1025	1-7
A	KITAGAWA, Y. et al., Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT., Clin Cancer Res., 2000, Vol.6, No.7, pages 2868 to 2875	1-7
P,X	Wirth T. et al., A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer., Cancer Res., 15 June, 2003 (15.06.03), Vol.63, No.12, pages 3181 to 3188	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

P JP03/08573

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claims 8-10 is relevant to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N7/01 // A61K48/00, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N7/01, A61K48/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, BIOSIS/WPI(DIALOG), JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Zhang J., et al., Identification of Human Uroplakin II Promoter and Its Use in the Construction of CG8840, a Urothelium-specific Adenovirus Variant That Eliminates Established Bladder Tumors in Combination with Docetaxel. Cancer Res. 2002.07.01, vol.62, no.13, p.3743-3750	1-7
Y	Kim J., et al., Antitumoral effects of recombinant adenovirus YKL-1001, conditionally replicating in small α -fetoprotein-producing human liver cancer cells. Cancer Letters, 2002.06.06, vol.180, no.1, p.23-32	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.10.03

国際調査報告の発送日

21.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Komata T., et al., Caspase-8 gene therapy using the human telomerase reverse transcriptase promoter for malignant glioma cells. Hum Gene Ther., 2002.06.10, vol.13, no.9, p.1015-1025	1 - 7
A	Kitagawa Y., et al., Demethylating reagent 5-azacytidine inhibits telomerase activity in human prostate cancer cells through transcriptional repression of hTERT. Clin Cancer Res., 2000, vol.6, no.7, p.2868-2875	1 - 7
PX	Wirth T., et al., A telomerase-dependent conditionally replicating adenovirus for selective treatment of cancer. Cancer Res., 2003.06.15, vol.63, no.12, p.3181-3188	1 - 7

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査がでないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (P C T 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8-10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
上記請求の範囲に記載された発明は、人の身体の治療による処置方法に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってP C T規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。